

IT 04/ 284



REC'D 27 AUG 2004

WIPO

PCT

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

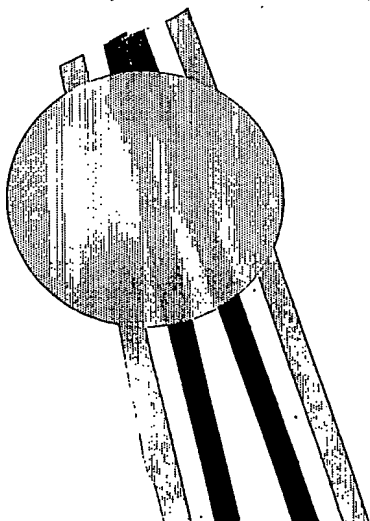


**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N° RM 2003 A 000247 del 20.05.2003**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

29 LUG. 2004

Roma, li.....



IL FUNZIONARIO
Ing. Giovanni de Sanctis

Giovanni de Sanctis

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Best Available Copy

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione COSTA, Maria Assunta
 Residenza PALERMO / IT codice CSTMSS61A46A670W

2) Denominazione GERACI, Domenico
 Residenza PALERMO / IT codice GRC DNC46T28G273H

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome CAPASSO Olga, DE SIMONE Domenico ed altri cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza DE SIMONE & PARTNERS SPA
 via Vincenzo Bellini n. 20 città ROMA cap. 00198 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario Vedi sopra.

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____

"VARIANTI IPOALLERGENICHE DEGLI ALLERGENI MAGGIORI DELLA PARIETARIA JUDAICA, LORO USI E COMPOSIZIONI".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) COSTA, Maria Assunta 3) COLOMBO, Paolo
 2) GERACI, Domenico 4) PASSANTINO, Rosa

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N°

1) Nessuna. _____
 2) _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione _____

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

I titolari partecipano ai diritti sul brevetto nella misura del 20% ciascuno ai sensi dell'Art. 19 R.D. 1127/39.

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Dob. 1) 1 PROV n. pag. 25 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) _____
 Doc. 2) 1 PROV n. tav. 12 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) _____
 Doc. 3) 1 RIS **dichiarazione sostitutiva della** _____
 Doc. 4) 0 RIS lettera d'incarico, _____
 Doc. 5) 0 RIS designazione inventore _____
 Doc. 6) 0 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano _____
 Doc. 7) 0 RIS autorizzazione o atto di cessione _____
 Doc. 7) 0 nominativo completo del richiedente _____

8) attestati di versamento, totale: _____

Euro 291,80.=

obbligatorio

COMPILATO IL 20/05/2003

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Olga CAPASSOCONTINUA SINO SIdella DE SIMONE & PARTNER SPADEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO SI

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA - ROMA

codice 58

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

RM 2003 A 000247

L'anno

DUEMILATRE

il giorno

VENTI

del mese di

MAGGIOIl (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, composta di n. 01 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE
 L'Ufficiale Rogante
 Silvia Altieri

A. RICHIEDENTE (I)

03 Denominazione **COLOMBO, Paolo** RM 2003 A 000247
 Residenza **PALERMO / IT** codice **CLMPLA60C20G273X** PE

04 Denominazione **PASSANTINO, ROSA**
 Residenza **PALERMO / IT** codice **PSSRSQ61P66Z614K** PE

05 Denominazione **BONURA, Angela**
 Residenza **PALERMO / IT** codice **BNRNGL67L54G273V** PE

Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

05 **BONURA, Angela**

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R

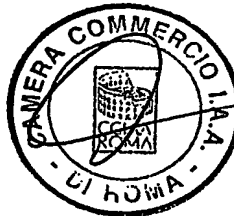
SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Olga CAPASSO**della DE SIMONE & PARTNERS SPA**

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

RM 2003 A 000247

DATA DI DEPOSITO

DATA DI DEPOSITO

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

COSTA Maria Assunta - GERACI Domenico - COLOMBO Paolo -

Residenza

PASSANTINO Rosa - BONURA Angela - Palermo / IT

D. TITOLO

"VARIANTI IPOALLERGENICHE DEGLI ALLERGENI MAGGIORI DELLA
PARIETARIA JUDAICA, LORO USI E COMPOSIZIONI".

Classe proposta (sez./cl./scl)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

E' descritta una molecola proteica multimerica comprendente almeno una prima sequenza amminoacidica avente sostanzialmente la sequenza di uno degli allergeni maggiori Parj1 o Parj2 da *Parietaria* e una seconda sequenza amminoacidica avente sostanzialmente la sequenza di uno degli allergeni maggiori Parj1 o Parj2 da *Parietaria*, nonché preferibilmente una terza sequenza di uno degli allergeni maggiori Parj1 o Parj2 da *Parietaria*. La molecola trova sue applicazioni per uso medico come ipoallergenico.

M. DISEGNO



DESCRIZIONE **RM 2003 A 000247**

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: "Varianti ipoallergeniche degli allergeni maggiori della *Parietaria judaica*, loro usi e composizioni"

a nome: COSTA MARIA ASSUNTA, GERACI DOMENICO, COLOMBO PAOLO, PASSANTINO ROSA, BONURA ANGELA

inventori: gli stessi Richiedenti

La presente invenzione concerne molecole proteiche ipoallergeniche derivate dagli allergeni maggiori della *Parietaria judaica*, loro usi e composizioni.

La reazione allergica, nota anche come ipersensibilità di Tipo I, è indotta da una risposta IgE-mediata ad antigeni ambientali usualmente innocui, presenti nella forfora animale, negli acari della polvere o nei granuli pollinici. La sintomatologia si manifesta sia con la formazione di ponfi ed eruzioni cutanee che con rino-congiuntivite, o con difficoltà respiratorie e patologie più gravi, come asma ed anafilassi.

Le allergie respiratorie stagionali sono anche definite allergie da polline in quanto gli allergeni responsabili sono molecole costituenti il polline di alcune piante. L'ipersensibilità non si manifesta al primo contatto con l'antigene, ma compare dopo una prima fase di sensibilizzazione. Il processo ha inizio quando l'allergene incontra le APC (cellule che presentano l'antigene), il cui ruolo principale è quello di captare l'antigene e digerirlo in piccoli frammenti, esponendoli sulla superficie della membrana in associazione a particolari glicoproteine, gli antigeni MHC di classe II (complesso maggiore di istocompatibilità).

Le allergie respiratorie si possono dividere, in base al periodo in cui si manifestano, in due grosse famiglie: stagionali e perenni. Nelle allergie respiratorie stagionali, gli allergeni responsabili della loro comparsa sono contenuti nel polline dei fiori che sbocciano massimamente nella stagione primaverile.

Durante il periodo in cui il polline si trova sospeso nell'atmosfera, esso viene inalato e raggiunge le mucose dell'apparato respiratorio dove l'involucro protettivo viene dissolto dagli enzimi e dall'acqua delle secrezioni presenti, determinando la liberazione delle proteine in esso contenute.

Le specie vegetali più comunemente allergeniche appartengono soprattutto ad alcune grandi famiglie quali: fagacee, urticacee, oliacee, composite e graminacee. Nell'Italia continentale la famiglia delle graminacee è la principale responsabile dei fenomeni allergici mentre nell'area mediterranea la principale pianta allergenica è la *Parietaria judaica* (Pj). Il genere *Parietaria* appartiene alla famiglia delle Urticacee e include cinque specie, che in ordine di importanza allergologica sono: *P. judaica*, *P. officinalis*, *P. lusitanica*, *P. cretica* e *P. mauritanica* [1]. I primi studi sperimentali condotti con i metodi CIE e CRIE, avevano evidenziato che il polline della *Parietaria judaica* contiene numerosi allergeni tra loro differenti sia per peso molecolare che per capacità di legare le IgE. Il peso molecolare varia da 10 a 80 KDa e gli allergeni trovati nella regione 10-14 kDa reagiscono con la totalità dei sieri di soggetti allergici, suggerendo che i principali allergeni sono presenti in questa regione [2,3]. Per l'isolamento degli allergeni maggiori della *Parietaria judaica* è stata utilizzata la tecnologia del DNA ricombinante

che ha permesso, partendo da una libreria di espressione, l'isolamento e la caratterizzazione di due allergeni maggiori, Par j1 e Par j2 e di alcune loro isoforme [4].

Del Parj1 sono state isolate due varianti denominate Parj 1.0102 e Parj 1.0201. Il Parj 1.0102 contiene un inserto di 794 nucleotidi, una sequenza amminoacidica dedotta di 176 aa ed un peso molecolare di 18.450 Da. La sequenza NH₂-terminale presenta una composizione in amminoacidi caratteristica di sequenze segnale di proteine glicosilate. La proteina matura è composta da 139 aa. Per un peso molecolare di 14.726 Da (vedi fig.1 pannello a). L'analisi di sequenza del clone Parj 1.0201 ha mostrato un inserto di 637 nucleotidi, una sequenza amminoacidica di 139 aa ed un peso molecolare di 14.400 Da. Anch'esso contiene una regione amminotermineale con caratteristiche di sequenze segnale. La proteina matura è composta da 102 aa per un peso molecolare di 10.677 Da. La regione codificante del Parj 1.0201 mostra 89% di identità a livello amminoacidico con il Parj 1.0102, ma l'assenza di omologia nelle regioni non tradotte 3' e 5' suggerisce che i due cloni derivano dalla trascrizione di geni indipendenti. In particolare il Parj 1.0201 può essere considerato una variante più corta di Parj 1.0102 [5,6].

Il clone Parj 2, isolato da una genoteca di cDNA, contiene un inserto di 622 nt con una corretta fase di lettura di 133 aa. ed un peptide segnale di 31 aa. La proteina matura è composta da 102 aa. ed ha un peso molecolare di 11.344 Da (vedi Fig.1 pannello C). Mostra una omologia del 45% a livello amminoacidico con il Parj1 ed è anch'esso un



allergene maggiore poiché reagisce con la quasi totalità dei sieri di soggetti allergici [7].

A dispetto della loro omologia strutturale, il Par j 1 ed il Par j 2 sono comunque due allergeni indipendenti, come messo in evidenza da esperimenti di inibizione crociata[7]. Inoltre, quando un pool di sieri di soggetti allergici viene preincubato con gli allergeni ricombinanti Parj1 e Parj2, il legame delle IgE alla regione 10-14 kDa del polline di *Parietaria judaica* viene totalmente inibito, suggerendo che solo questi due allergeni sono presenti in questa regione e che insieme sono capaci di inibire la maggioranza delle IgE specifiche rivolte contro gli allergeni della *Parietaria judaica* [7].

Inoltre, da una ricerca presso la banca dati dell'EMBL, è stato visto che il Par j1 e il Parj 2 appartengono ad una famiglia di proteine note come "non specific lipid transfer protein" (ns-LTPs) in grado di trasportare molecole lipidiche attraverso le membrane cellulari. Queste proteine presentano numerose caratteristiche comuni tra le quali la presenza di otto cisteine in grado di generare quattro ponti disolfuro con conseguente struttura secondaria ben conservata secondo un motivo α - α - α - β (Fig.2) [8].

Il Par j 1 presenta tutte le caratteristiche delle ns-LTP ed è stato possibile determinarne il modello strutturale utilizzando come riferimento il cristallo della ns-LTP del seme di soia. Secondo tale modello, il Par j 1 ed il Parj2 presentano 4 ponti di solfuro secondo l'ordine: 4-52, 14-29, 30-75, 50-91. Inoltre, applicando una strategia di mutagenesi sito specifica, abbiamo dimostrato l'importanza dei ponti disolfuro nella formazione degli epitopi IgE e l'esistenza di un epitopo

dominante nella regione loop1 compresa tra gli amminoacidi 1 e 30 (Fig.3 e [8]).

Mentre la sintomatologia dell'allergia può essere curata farmacologicamente, l'unica terapia "preventiva" è rappresentata dall'immunoterapia specifica (SIT) con la quale quantità diluite dell'allergene vengono somministrate per via sottocutanea al paziente in maniera tale da sopprimere la reazione specifica nei confronti dell'allergene [9]. La maggior parte degli estratti proteici usati in commercio sono comunque degli estratti crudi, miscele di numerosi componenti in cui una precisa standardizzazione della componente allergenica è difficile.

Inoltre la strategia può comportare la somministrazione di componenti allergenici cui il paziente non è sensibile inducendo la produzione di IgE specifiche verso altri componenti l'estratto [10]. In aggiunta, la somministrazione dell'allergene *in toto* presenta la possibilità di effetti collaterali che possono causare anche shock anafilattico. Per eliminare alcuni degli svantaggi appena descritti, uno degli obiettivi principali è la caratterizzazione e lo sviluppo di molecole alternative con ridotti effetti collaterali, capaci cioè di non interagire con le IgE. La modifica degli allergeni nativi nel tentativo di generare molecole con ridotta capacità anafilattica è già stata proposta nel passato da Marsh e collaboratori i quali suggerirono la produzione di estratti crudi polimerizzati con formaldeide o gluteraldeide [11]. Trials clinici dimostrarono l'efficacia di tali molecole modificate anche se quest'ultime presentavano tutti i limiti già precedentemente descritti riguardanti la difficoltà di standardizzazione degli estratti stessi. La possibilità di modificare

geneticamente gli allergeni rappresenta invece una soluzione di maggiore affidabilità poiché la conoscenza della sequenza nucleotidica e quindi amminoacidica di tali molecole permette la produzione di proteine mutate in forma pura ed in maniera assolutamente riproducibile.

La domanda di brevetto WO 02/20790 concerne varianti della famiglia di allergeni ns-LTP, a cui appartengono gli allergeni della presente invenzione, con una diminuita capacità di formare ponti disolfuro.

La domanda di brevetto WO 02/22674 concerne varianti ipoallergeniche dell'allergene maggiore Parj2 in cui sono sostituiti o deleti residui lisinici. Tuttavia entrambi i documenti di tecnica anteriore concernono varianti di un allergene specifico, e non forniscono una molecola ingegnerizzata in maniera tale da comprendere multimeri di singoli allergeni e/o regioni provenienti da allergeni diversi, vantaggiosamente utilizzabile come principio unico ipoallergenico.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione una molecola proteica multimerica comprendente almeno una prima sequenza amminoacidica avente sostanzialmente la sequenza di uno degli allergeni maggiori Parj1 o Parj2 da *Parietaria* e una seconda sequenza amminoacidica avente sostanzialmente la sequenza di uno degli allergeni maggiori Parj1 o Parj2 da *Parietaria*.

In una forma preferita di attuazione la molecola proteica multimerica dell'invenzione ulteriormente comprende almeno una terza sequenza di uno degli allergeni maggiori Parj1 o Parj2 da *Parietaria*.

In una forma preferita di attuazione la sequenza dell'allergene maggiore Parj1 è la sequenza A di Fig. 1 e la sequenza dell'allergene maggiore Parj2 è la sequenza C di Fig. 1.

In una forma preferita di attuazione la sequenza dell'allergene maggiore Parj1 e/o dell'allergene maggiore Parj2 da *Parietaria* è mutata nella regione amminoacidica formante il loop 1, sostanzialmente compresa dall'aa. 1 all'aa. 30; preferibilmente la sequenza mutata dell'allergene maggiore Parj1 è la sequenza B di Fig. 1; preferibilmente la sequenza mutata dell'allergene maggiore Parj2 è la sequenza D di Fig. 1. Ancora più preferibilmente la sequenza dell'allergene maggiore Parj1 è la sequenza B di Fig. 1 e la sequenza mutata dell'allergene maggiore Parj2 è la sequenza D di Fig. 1.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un acido nucleico codificante per la molecola proteica multimerica dell'invenzione stessa.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un vettore ricombinante per espressione in cellule procariote comprendente sotto il controllo di un opportuno sistema di promozione della trascrizione l'acido nucleico dell'invenzione stessa.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un vettore ricombinante per espressione in cellule eucariote comprendente sotto il controllo di un opportuno sistema di promozione della trascrizione l'acido nucleico dell'invenzione stessa.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione una molecola proteica multimerica secondo l'invenzione per uso medico, preferibilmente come ipoallergenico.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione una composizione farmaceutica comprendente quantità efficaci ed accettabili della molecola proteica multimerica secondo l'invenzione stessa e opportuni adiuvanti e/o diluenti.



L'invenzione verrà ora descritta in sue forme di realizzazione esemplificative ma non limitative, facendo riferimento alle seguenti figure:

Figura 1. Sequenze amminoacidiche degli allergeni maggiori Parj1 (Seq.A) e Parj2 (Seq.C). La sequenza B mostra il derivato ipoallergenico di Parj1 mutato nella regione loop1; la sequenza D mostra il derivato ipoallergenico di Parj2 nella regione loop1; gli amminoacidi sottolineati indicano le mutazioni inserite.

Figura 2. Rappresentazione schematica del modello tridimensionale del Parj1 raffigurante la struttura composta da quattro alfa elica tipico della famiglia delle nsLTP.

Figura 3. Allineamento delle sequenze amminoacidiche del Par J 1.0102 e Par j 2.0101 in rapporto alla loro struttura tridimensionale. La numerazione si riferisce alla sequenza del Par j 1.0102. Le frecce indicano gli amminoacidi sostituiti.

Figura 4. Rappresentazione schematica delle costruzioni plasmidiche. I numeri indicano la posizione degli amminoacidi a partire dalla prima metionina espressa dai vettori d'espressione pQE30 e pQE31 utilizzati per l'espressione delle proteine ricombinanti. Gli amminoacidi aggiunti o sostituiti sono indicati.

Figura 5. Test ELISA raffigurante la capacità dei mutanti Pj1loop e Pj2loop di legare le IgE umane paragonati alle loro rispettive molecole

wild type. Le linee con quadrati neri indicano sieri di soggetti allergici alla Pj; la linea con quadrati bianchi l'attività di legame di un siero di un soggetto non allergico.

Figura 6. Curve di rilascio di istamina dei mutanti Pj1loop, PjED e PjEDmut. I pannelli da A ad E indicano i valori di rilascio di istamina del mutante Pj1loop e della molecola Parj1 wild type. I pannelli da F ad H indicano i valori di rilascio di istamina dei mutanti PjED e PjEDmut rispetto ad una miscela contenente una quantità equimolecolare degli allergeni Parj1 e Parj2. Ogni pannello rappresenta un singolo paziente allergico. I valori sull'asse delle ascisse indicano la concentrazione dell'antigene utilizzato espresso in $\mu\text{g/ml}$. I valori sull'asse delle ordinate esprimono la percentuale di rilascio rispetto alla quantità totale di istamina.

Figura 7. Test ELISA condotto utilizzando le molecole Parj1 wild type (Pj1) e Pj1loop come antigeni. I valori riportati sull'asse delle ordinate indicato la capacità di legame delle molecole nei confronti di un anticorpo policlonale rivolto contro la molecola Parj1.

Figura 8. Curve di rilascio di istamina del mutante Pj2trimero rispetto ad una quantità equimolecolare dell'allergene Parj2 in forma monomerica. I pannelli da A a D indicano i valori di rilascio per singolo paziente allergico. L'asse delle ascisse indica la concentrazione dell'antigene utilizzato espresso in ng/ml . L'asse delle ordinate esprime la percentuale di rilascio rispetto alla quantità totale di istamina.

Figura 9. Curve di rilascio di istamina del mutante eterotrimero rispetto alle molecole Parj1 e Parj2 in forma monomerica. I pannelli da A a C indicano i valori di rilascio per singolo paziente allergico. I valori

sull'asse delle ascisse indicano la concentrazione dell'antigene utilizzato espresso in $\mu\text{g/ml}$. I valori sull'asse delle ordinate esprimono la percentuale di rilascio rispetto alla quantità totale di istamina.

MATERIALI E METODI

Clonazione ed espressione di Parj1 e Parj2 "Wild Type"

Per la produzione dell'allergene maggiore della *Parietaria judaica* Par j 1 è stato utilizzato il vettore procariotico pQE30 (Qiagen). Il vettore presenta la caratteristica di esprimere proteine ricombinanti fuse ad una breve coda di istidine ed inducibili con l'isopropil- β -D-tiogalattoside (IPTG). I residui di istidina permettono la purificazione della proteina ricombinante tramite cromatografia per affinità.

Il clone p5 contenente la versione processata del Par j 1 (EMBLaccession number X77414) è stato sottoposto ad un ciclo di polimerizzazione a catena del DNA (PCR) secondo il seguente schema: 94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min per 30 cicli. Sono stati utilizzati gli oligonucleotidi sintetici Parj1.0102 forward (5' ATT **GGATCCCAAGAAACCTGCGGGACTATG** 3') e par j 1.0102 reverse (5' ATTA**AGCTTGGCTTTTTCCGGTGCGGG** 3') (in grassetto sono indicate le sequenze degli enzimi di restrizione utilizzati). L'allergene maggiore Parj2 è stato prodotto utilizzando lo stesso vettore e le stesse metodologie descritte per il Parj1 con la sola eccezione degli oligonucleotidi e dello stampo. A tal scopo sono stati utilizzati come stampo la sequenza del clone P2 (EMBL accession number X95865) e gli oligonucleotidi Parj2 forward (5' **CCTGGATCCGAGGAGGCTTGCGGG** 3') e Parj2 reverse (5'

GCG**AAGCTT**ATAGTAACCTCTGAAAATAGT 3') (in grassetto sono indicate le sequenze degli enzimi di restrizione).

I frammenti così generati sono stati frazionati su gel di agarosio all'1% in 1x TBE, estratti dal gel, purificati e digeriti con gli enzimi di restrizione Bam H1 e Hind III. Il vettore pQE30 è stato a sua volta digerito con gli stessi enzimi di restrizione. Il vettore linearizzato ed i frammenti digeriti sono stati incubati a 16°C per 4 ore in presenza dell'enzima DNA ligasi secondo diversi rapporti stechiometrici. La miscela di reazione è stata utilizzata per trasformare il ceppo batterico M15. I cloni ricombinanti sono stati isolati ed il DNA plasmidico sequenziato con il metodo di Sanger. La sequenza nucleotidica così determinata ha dimostrato che il frammento di DNA inserito all'interno del vettore pQE30 era identico a quanto da noi già pubblicato.

Costruzione di Mutanti Loop1 di Parj1 e Parj2

Mutanti puntiformi di Parj1 e Parj2 sono stati generati mediante PCR utilizzando come stampo i cDNA precedentemente descritti codificanti per le versioni "wild type" di questi allergeni. In particolare, per il clone Pj1loop sono stati utilizzati gli oligonucleotidi:

Parj1-fwd (5'-ATT**GGATCC**CAAGAAACCTGCGGGACTATG-3')

LOOP1mut-rev

(5'-AA**ACTGCAGC**ACCCCgcTGACGGCgCTgcCTCTTTCC-3'),

per sintetizzare un frammento di DNA codificante per i primi 30 amminoacidi ammino-terminali di Parj1, in cui gli amminoacidi Lys23, Glu24, Lys27 sono stati sostituiti con l'amminoacido neutro alanina. Il frammento di DNA così generato è stato digerito alle estremità 5' e 3' rispettivamente con gli enzimi di restrizione BamH I e Pst I e introdotto

"in frame" nel vettore di espressione Pj1 digerito con gli stessi enzimi di restrizione (in grassetto sono indicati i siti per gli enzimi di restrizione utilizzati per il clonaggio, in minuscolo i nucleotidi sostituiti per la mutagenesi; per la numerazione e la posizione degli amminoacidi vedi Fig.1 pannello B, Fig. 3 e Fig.4).



Per il clone Pj2loop, sono stati utilizzati gli oligonucleotidi:

Parj2 fwd (5'-GTGGGATCCGAGGAGGCTTGCGGGAAAGTGGTGCAG-3')

Parj2 mut-rev

(5'-AAACTGCAGCACTCCgcCGACGGCgCCgcCTCCTCCC-3'),

per sintetizzare un frammento di DNA codificante per i primi 30 amminoacidi dell'ammino terminale di Parj2 in cui gli amminoacidi Lys23, Glu24, Lys27 sono stati sostituiti con l'amminoacido neutro alanina. Il frammento di DNA così generato è stato digerito alle estremità 5' e 3' rispettivamente con gli enzimi di restrizione BamH I e Pst I e introdotto nel vettore di espressione Pj2 digerito con gli stessi enzimi di restrizione.

(In grassetto sono indicati i siti per gli enzimi di restrizione utilizzati per il clonaggio, in minuscolo i nucleotidi sostituiti per la mutagenesi; per la numerazione e la posizione degli amminoacidi vedi Fig.1 pannello E, Fig. 3 e Fig.4).

Costruzione di una molecola dimerica contenente l'informazione genetica per Parj1 e Parj2 in forma wild type e mutata nella regione Loop1

Per la costruzione di una molecola eterodimerica contenente l'informazione genetica per gli allergeni maggiori Parj1 e Parj2, è stato inizialmente generato un frammento di DNA contenente la sequenza wild type del Parj2 utilizzando gli oligonucleotidi sintetici:

Pj2-for (5'-GTGGGATCCGAGGAGGCTTGCGGGAAAGTGGTGCAG-3')

e

Pj2-rev (5'-CGCGGATCCATAGTAACCTCTGAAAATAGT-3') ed il clone

Pj2 come stampo e alle seguenti condizioni di PCR: 94° C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min per 30 cicli. Il frammento così ottenuto è stato purificato e digerito con l'enzima di restrizione BamH1 ed inserito nel plasmide Pj1 precedentemente digerito con lo stesso enzima di restrizione. I plasmidi ricombinanti contenenti una copia del frammento Parj2 inserito nell'orientamento corretto sono stati isolati e saggiati per la capacità di esprimere proteine multimeriche ricombinanti stabili (dimeri Parj2-Parj1) (Fig.4, clone PjED). Introducendo i siti di restrizione utilizzati per clonare i frammenti si sono comunque introdotti due amminoacidi (G e S) a livello dei siti di giunzione, senza che venga spostata la corretta fase di lettura.

L'eterodimero contenente una copia di ciascuno degli allergeni Parj1 e Parj2 mutagenizzati nella regione loop1 è stato generato utilizzando una strategia di PCR identica a quanto già descritto per la formazione dell'eterodimero Parj1-Parj2, modificando esclusivamente lo stampo utilizzato per la PCR. In particolare, il clone Pj2loop è stato sottoposto ad amplificazione utilizzando gli oligonucleotidi Pj2-for e Pj2-rev. Il frammento così ottenuto è stato purificato e digerito con l'enzima di restrizione BamH1 ed inserito nel plasmide Pj1loop precedentemente digerito con lo stesso enzima di restrizione. I plasmidi ricombinanti contenenti una copia del frammento Pj2loop inserito nell'orientamento corretto sono stati isolati e saggiati per la capacità di esprimere proteine dimeriche ricombinanti stabili (dimeri Parj2-Parj1 mutati entrambi nella regione loop1) (Fig.3 e Fig.4 [clone PjEDmut]). Introducendo i siti di

restrizione utilizzati per clonare i frammenti si sono introdotti due aminoacidi (G e S) a livello dei siti di giunzione che non modificano la corretta fase di lettura (Fig.4 eterotrimerico).

Costruzione di una molecola multimerica di Parj2 e di un eterotrimerico contenente entrambi gli allergeni maggiori

Per la costruzione del trimero di Parj2 sono stati utilizzati il vettore plasmidico pQE31, il DNA codificante per la proteina ricombinante Parj2 ed il ceppo batterico XLI blue di *E.coli*. Sono state utilizzate le quattro endonucleasi di restrizione Bam HI, Sac I, Sal I ed Hind III.

Per potere inserire ai lati della sequenza del DNA di Parj2 i siti di restrizione per gli enzimi di interesse, senza intaccarne la sequenza, il DNA di Parj2 è stato amplificato mediante PCR con i seguenti primer:

Direct Bam HI: 5'- CCT**GGATC**CTGAGGAGGCTTGCGGG-3'

Reverse Sac I: 3'- CCT**GAGCT**CATAGTAACCTCTGAA-5'

Direct Sac I: 5'- CCT**GAGCT**CGAGGAGGCTTGCGGG-3'

Reverse Sal I: 3'- CCT**GTGAC**CATAGTAACCTCTGAA-5'

Direct Sal I: 5'- CCT**GTGAC**GAGGAGGCTTGCGGG-3'

Reverse Hind III: 3'- CCT**AAGCTT**CTAATAGTAACCTCT-5'

e alle seguenti condizioni: 94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min per 30 cicli (in grassetto sono indicati i siti per gli enzimi di restrizione).

Per costruire il plasmide ricombinante contenente il primo monomero di Parj2, è stato amplificato il cDNA contenente l'informazione genetica per l'allergene Parj2 con i primer Direct Bam HI e Reverse Sac I. In questo modo è possibile digerire, con gli enzimi Bam HI e Sac I, i prodotti di PCR così ottenuti senza intaccare la sequenza nucleotidica

codificante per la proteina Parj2. Il DNA così digerito viene ligato, nella corretta fase di lettura, al vettore pQE31 digerito con gli stessi enzimi.

Il plasmide ricombinante così ottenuto viene quindi usato per trasformare il ceppo batterico XL1blue e i cloni positivi, indotti con IPTG, vengono analizzati tramite western blot e ibridazione con l'anticorpo His-probe che riconosce le sei istidine presenti nella proteina ricombinante. La correttezza della clonazione è stata confermata sequenziando il DNA plasmidico ricombinante.

Per la costruzione del clone dimerico, tale costruzione plasmidica è stata digerita con gli enzimi SacI e Sall. Il plasmide così linearizzato è stato in seguito incubato con un frammento di DNA contenente l'allergene Parj2 dopo amplificazione tramite PCR utilizzando i primer direct SacI e reverse Sall; i cloni ricombinanti sono stati analizzati e controllati come precedentemente descritto.

Per costruire il clone contenente la costruzione trimerica, è stato digerito il DNA plasmidico contenente il dimero di Parj2 con gli enzimi Sall e HindIII e questo è stato incubato, in una reazione di ligasi, con un frammento di DNA contenente l'informazione per il Parj2 amplificato con i primer direct Sall e reverse HindIII; da notare che in questo ultimo clone viene inserito un codone di stop. La clonazione viene infine confermato dal sequenziamento del DNA plasmidico ricombinante.

Introducendo i siti di restrizione utilizzati per clonare i frammenti si sono introdotti due aminoacidi (G e S) a livello dei siti di giunzione che non modificano la corretta fase di lettura (fig.4 eterotrimerico).

Per la costruzione di molecole eteromultimeriche contenenti entrambi gli allergeni maggiori Parj1 e Parj2 è stata utilizzata seguita la



strategia già descritta per il clone PjED. I plasmidi ricombinanti contenenti due copie del frammento Parj2 inserite nell'orientamento corretto sono stati isolati e saggiati per la capacità di esprimere proteine multimeriche ricombinanti stabili (trimeri Parj2-Parj2-Parj1). Introducendo i siti di restrizione utilizzati per clonare i frammenti si sono introdotti due aminoacidi (G e S) a livello dei siti di giunzione che non modificano la corretta fase di lettura (fig.4 eterotrimerico).

Induzione e purificazione delle proteine ricombinanti

10 ml di una coltura o/n sono utilizzati per un inoculo in 400 ml di terreno di coltura 2YT contenente ampicillina e kanamicina ad una concentrazione finale di 100 $\mu\text{g/ml}$ e 10 $\mu\text{g/ml}$ rispettivamente. La crescita avviene a 37°C e in agitazione. Dopo due ore alla coltura viene quindi aggiunto IPTG alla concentrazione finale 1 mM e la crescita prosegue per ulteriori 4 ore a 37°C in agitazione. Alla fine di questo periodo, la coltura batterica è centrifugata a 5000 rpm per 15 minuti. Il pellet è risospeso in Start buffer (10mM Nafosfato pH7,4 e 6 M urea) e le cellule vengono distrutte utilizzando un sonificatore. Il lisato viene così centrifugato a 14000 rpm per 30 minuti e, il lisato così chiarificato, viene caricato su una colonna CM Sepharose (Pharmacia). Le proteine vengono eluite utilizzando un gradiente discontinuo di NaCl e le frazioni contenenti la proteina di interesse sono dializzate per due ore contro un buffer contenente 10mM Nafosfato pH7,4 e 1 M NaCl per consentire la formazione della struttura tridimensionale nativa. Le proteine ricombinanti sono state poi definitivamente purificate utilizzando una colonna del tipo His Trap (Amersham) seguendo le istruzioni della casa fornitrice. Le frazioni eluite sono state analizzate su gel di

poliacrilammide al 16% e le frazioni contenenti la proteina ricombinante sono state valutate quantitativamente allo spettrofotometro dopo colorazione con il metodo di Bradford. Infine le proteine sono state desalate utilizzando una colonna di Sephadex G-25 (Pharmacia).

Le proteine prodotte per vie ricombinante sono state analizzate per elettroforesi su gel di poliacrilammide al 16% in SDS. La loro purezza e concentrazione è stata determinata mediante colorazione con Comassie brilliant blue.

ELISA

La determinazione del test ELISA è stata effettuata come descritto nel lavoro Bonura et al. (13). La concentrazione dell'antigene utilizzato in ogni pozzetto è di 5 $\mu\text{g/ml}$. I pazienti utilizzati ($n=8$) presentavano una chiara storia di allergia alla *Parietaria judaica* e tutti mostravano positività allo skin test utilizzando prodotti commerciali.

Rilascio di istamina

Il saggio di rilascio di istamina è stato effettuato utilizzando sangue eparinizzato da soggetti allergici alla *Parietaria judaica* ed utilizzando una scala di concentrazione di allergene compresa tra 0,0001 e 10 $\mu\text{g/ml}$. Il protocollo di rilascio è stato effettuato come già precedentemente descritto [13]. S-adenosyl-L-methionine- H^3 (Amersham, UK) è stato utilizzato come marcatore radioattivo della reazione in presenza dell'enzima histamine methyltransferase preparato da rene di ratto maschio. La quantità totale di istamina è stata calcolata misurando la radioattività di 100 μl di sangue diluito con 1 volume di 0,05 M tampone fosfato pH 7,9 e dopo bollitura del campione per 10 min. Il rilascio spontaneo viene calcolato incubando il campione

in presenza del tampone di diluizione. La percentuale di istamina rilasciata è stata calcolata come percentuale dell'istamina rilasciata dopo aver sottratto la percentuale rilasciata spontaneamente dal campione in assenza di stimolo.

RISULTATI

L'allergia al polline della *Parietaria judaica* è una delle forme di allergia maggiormente diffuse nell'area del Mediterraneo. In particolare, il Par j 1 ed il Par j 2 sono i due attori principali della risposta allergica e pertanto rappresentano i due obiettivi principali per la ricerca di eventuali prodotti da utilizzare nella immunoterapia specifica della allergia alla *Parietaria judaica*. Essi sono due allergeni indipendenti e presentano delle caratteristiche strutturali simili in quanto appartenenti alla famiglia delle nsLTP. Questa famiglia di proteine vegetali è stata caratterizzata a livello strutturale: tutti i componenti possiedono una struttura molto compatta comprendente 4 alfa eliche (vedi Fig.2) tenute insieme dalla presenza di otto residui cisteinici in grado di formare 4 ponti di solfuro secondo l'ordine 4-52, 14-29, 30-75, 50-91 (la numerazione si riferisce alla sequenza primaria del Par j 1 maturo riportata, Fig. 1 pannello A). Tutte le strategie qui di seguito descritte, mirano alla realizzazione di molecole con ridotta capacità allergenica pur mantenendo una struttura tridimensionale simile alle rispettive molecole native. In particolare, la mutagenesi sito-specifica a carico degli amminoacidi Lys23, Glu24, Lys27 di Parj1 e di Parj2 compresi nella regione definita loop1 (vedi Fig.1, Fig.2 e Fig.3), ha dimostrato di influenzare enormemente la capacità di legame con IgE umane. Infatti la Fig.5 mostra un'analisi ELISA in cui è possibile osservare una brusca

riduzione di legame con le IgE per i mutanti Pj1loop e Pj2loop giungendo ad un livello di attività paragonabile a quello di un siero di un paziente non allergico. La Fig.6 mostra lo schema di rilascio di istamina quando sangue intero di pazienti allergici (n=5) alla Pj è incubato con quantità crescenti del mutante Pj1loop o della molecola wild type. Il 40% di tali soggetti presenta una percentuale di rilascio inferiore a quella rilasciata dalla molecola wild type (Fig.6 pannelli C ed E). I rimanenti pazienti mostrano una certa eterogeneità di risposta con profili paragonabili a quello della molecola wild type. Questo tipo di mutagenesi sembra non interferire con la struttura generale della proteina. Infatti la Fig.7 mostra un test ELISA in cui sono state paragonate le molecole Pj1 wild type e Pj1 loop per la loro capacità di legare un anticorpo policlonale di coniglio ottenuto mediante immunizzazione con la molecola Pj1 *wild type*. L'analisi dimostra una forte percentuale di legame anche per la molecola Pj1 loop dimostrando la persistenza di numerosi domini strutturali proteici paragonabili a quelli della molecola di origine.

Questa strategia dimostra che una modifica di soli tre amminoacidi, localizzati in una regione esposta al solvente e che non interferisce con la struttura tridimensionale della proteina (vedi modello descritto in Fig.2 e dati riportati in Fig.7), è in grado di ridurre in maniera cospicua la quantità di IgE specifiche legate, quando paragonata alle rispettive molecole *wild type* (vedi Fig.6). Questo suggerisce che le molecole sono una soluzione valida ed applicabile per tutta la popolazione dei soggetti allergici alla *Parietaria judaica*. Alla luce di tali dati e partendo dalla osservazione che entrambi gli allergeni sono in grado di indurre la



produzione di IgE nei soggetti allergici al polline di *Parietaria judaica*, è stato deciso di generare una nuova classe di molecole formata dalla fusione testa-coda dei due singoli allergeni nel tentativo di generare un'unica formulazione farmacologica da utilizzare nella terapia desensibilizzante al polline di Pj. Inoltre, per altre sorgenti allergeniche è stato dimostrato che la multimerizzazione di singoli peptidi può avere come effetto la formazione di proteine con ridotta capacità anafilattica [11,12]. A tal fine, è stata generata una costruzione plasmidica costituita dalla fusione testa-coda del Parj2 e del Parj1 nelle loro versioni native (Fig.4 clone PjED per dettagli) e, in contemporanea, è una costruzione plasmidica costituita dalla fusione testa-coda dei cloni Pj1loop e Pj2loop (Fig.4 clone PjEDmut). Il mutante contiene le sequenze codificanti per i due allergeni maggiori entrambi modificati negli amminoacidi in posizione 23, 24 e 27 (Fig.1). L'attività di legame dei cloni PjED e PjEDmut è stata saggiata utilizzando la tecnica del rilascio di istamina. La loro attività è stata paragonata con l'attività di una miscela equimolare dei due monomeri Parj1 e Parj2. Dall'analisi dei grafici riportati in Fig.6 pannelli F,G ed H si evince che l'associazione dei due allergeni (clone PjED) ha come effetto una minore capacità di rilascio di istamina in alcuni soggetti (Fig.6 pannelli G ed H) e, in maniera ancora più marcata il doppio mutante (PjEDmut) presenta una ridotta capacità di rilascio istamina in uno dei pazienti analizzati (Fig.6 pannello F).

Alla luce dei risultati appena mostrati per i mutanti PjED e PjEDmut in cui un evento di polimerizzazione per sé può avere, in alcuni pazienti, effetto di riduzione dell'attività anafilattica, è stato deciso di generare multimeri in cui sono state fuse varie copie degli allergeni Parj1 e Parj2.

In maggiore dettaglio, il mutante Pj2trimero è costituito da tre copie dell'allergene Parj2 fuse testa-coda come raffigurato nella Figura 4. La molecola è stata studiata in un test di rilascio di istamina utilizzando 4 soggetti allergici al polline di *Parietaria judaica*. Tutti i pazienti saggiati presentano una marcata riduzione del rilascio di istamina quando la loro attività è paragonata a quella del Parj2 in forma monomerica (Fig.8); allo stesso modo, quando due copie dell'allergene Parj2 vengono fuse testa-coda con una copia dell'allergene Parj1 (Fig.4 clone eterotrimero) si ottiene una molecola multimerica ibrida le cui caratteristiche allergeniche vengono studiate paragonandole all'attività dei loro corrispondenti allergeni in forma monomerica. Anche in questo caso, nei 3 soggetti esaminati è stato possibile osservare una riduzione del rilascio di istamina da sangue di pazienti allergici (Fig.9).

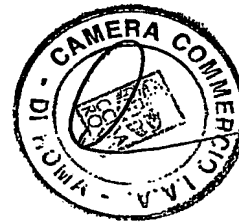
In conclusione, sono stati descritti la progettazione, la produzione e l'analisi allergologica di due famiglie di mutanti dei due allergeni maggiori della *Parietaria judaica* Parj1 e Parj2 con ridotta attività allergenica.

Bibliografia

- [1] D'Amato, G. et al. (1998) Allergy 53, 567-78.
- [2] Geraci, D., Oreste, U. and Ruffilli, A. (1978) Immunochemistry 15, 491-8.
- [3] Corbi, A.L. and Carreira, J. (1984) Int Arch Allergy Appl Immunol 74, 318-23.
- [4] Colombo, P., Duro, G., Costa, M.A., Izzo, V., Mirisola, M., Locorotondo, G., Cocchiara, R. and Geraci, D. (1998) Allergy 53, 917-21.

- [5] Costa, M.A. et al. (1994) FEBS Lett 341, 182-6.
- [6] Duro, G. et al. (1997) Int Arch Allergy Immunol 112, 348-55.
- [7] Duro, G. et al. (1996) FEBS Lett 399, 295-8.
- [8] Colombo, P. et al. (1998) J Immunol 160, 2780-5.
- [9] Bousquet, J., Lockey, R. and Malling, H.J. (1998) J Allergy Clin Immunol 102, 558-62.
- [10] Moverare, R., Elfman, L., Vesterinen, E., Metso, T. and Haahtela, T. (2002) Allergy 57, 423-30.
- [11] Marsh, D.G., Lichtenstein, L.M. and Campbell, D.H. (1970) Immunology 18, 705-22.
- [12] Vrtala, S. et al. (2001) Faseb J 15, 2045-7.
- [13] Bonura, A. et al. (2001) Int. Arch. Allergy Immunol. 126, 32-40

algos copress



RIVENDICAZIONI

1. Molecola proteica multimerica comprendente almeno una prima sequenza amminoacidica avente sostanzialmente la sequenza di uno degli allergeni maggiori Parj1 o Parj2 da *Parietaria* e una seconda sequenza amminoacidica avente sostanzialmente la sequenza di uno degli allergeni maggiori Parj1 o Parj2 da *Parietaria*.
2. Molecola proteica multimerica secondo la rivendicazione 1, ulteriormente comprendente almeno una terza sequenza di uno degli allergeni maggiori Parj1 o Parj2 da *Parietaria*.
3. Molecola proteica multimerica secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui la sequenza dell'allergene maggiore Parj1 è la sequenza A di Fig. 1 e la sequenza dell'allergene maggiore Parj2 è la sequenza C di Fig. 1.
4. Molecola proteica multimerica secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui la sequenza dell'allergene maggiore Parj1 e/o dell'allergene maggiore Parj2 da *Parietaria* è mutata nella regione amminoacidica formante il loop 1, sostanzialmente compresa dall'aa. 1 all'aa. 30.
5. Molecola proteica multimerica secondo la rivendicazione 4 in cui la sequenza mutata dell'allergene maggiore Parj1 è la sequenza B di Fig. 1.
6. Molecola proteica multimerica secondo la rivendicazione 4 in cui la sequenza mutata dell'allergene maggiore Parj2 è la sequenza D di Fig. 1.
7. Molecola proteica multimerica secondo la rivendicazione 4 in cui la sequenza dell'allergene maggiore Parj1 è la sequenza B di Fig. 1 e

la sequenza mutata dell'allergene maggiore Parj2 è la sequenza D di Fig. 1.



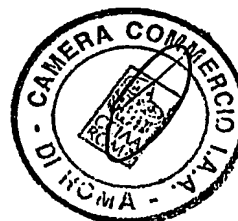
8. Acido nucleico codificante per la molecola proteica multimerica secondo una delle rivendicazioni precedenti.
9. Vettore ricombinante per espressione in cellule procariote comprendente sotto il controllo di un opportuno sistema di promozione della trascrizione l'acido nucleico secondo la rivendicazione 8.
10. Vettore ricombinante per espressione in cellule eucariote comprendente sotto il controllo di un opportuno sistema di promozione della trascrizione l'acido nucleico secondo la rivendicazione 8.
11. Molecola proteica multimerica secondo una delle rivendicazioni da 1 a 7 per uso medico.
12. Molecola proteica multimerica secondo una delle rivendicazioni da 1 a 7 per uso medico come ipoallergenico.
13. Composizione farmaceutica comprendente quantità efficaci ed accettabili della molecola proteica multimerica secondo una delle rivendicazioni da 1 a 7 e opportuni adiuvanti e/o diluenti.

Roma,

p.p. Costa Maria Assunta, Geraci Domenico, Colombo Paolo,
Passantino Rosa, Bonura Angela

DE SIMONE & PARTNERS S.p.A. (OC)

de Simone



RM 2003 A 000247

A

1 50
 QETCGTMVRALMPCLPFVQGKEKEPSKGCCSGAKRLDGETKTGPQRVHAC
 51 100
 ECIQTAMKTYSDIDGKLVSEVPKHCGIVDSKLPPIDVNMDCKTVGVVPRQ
 101
 PQLPVSLRHGPVTGPSDBAHKARLERPQIRVPPPAPEKA

B

1 50
 QETCGTMVRALMPCLPFVQGEAAPSAGCCSGAKRLDGETKTGPQRVHAC
 51 100
 ECIQTAMKTYSDIDGKLVSEVPKHCGIVDSKLPPIDVNMDCKTVGVVPRQ
 101
 PQLPVSLRHGPVTGPSDBAHKARLERPQIRVPPPAPEKA

C

1 50
 EEACGKVVQDIMPCLHFKVKGEEKEPSKECCSGTKKLSEEVKTTEQKREAC
 51 100
 KCIVRATKGISGIKNELVAEVPKKCDIKTTLPITADFDCSKIQSTIFRG
 101
 YY

D

1 50
 EEACGKVVQDIMPCLHFKVGEEAPSAECESGTKKLSEEVKTTEQKREAC
 51 100
 KCIVRATKGISGIKNELVAEVPKKCDIKTTLPITADFDCSKIQSTIFRG
 101
 YY

Fig.1



UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Olga Capasso
 (N° d'iscr. 820 B)

Olga Capasso

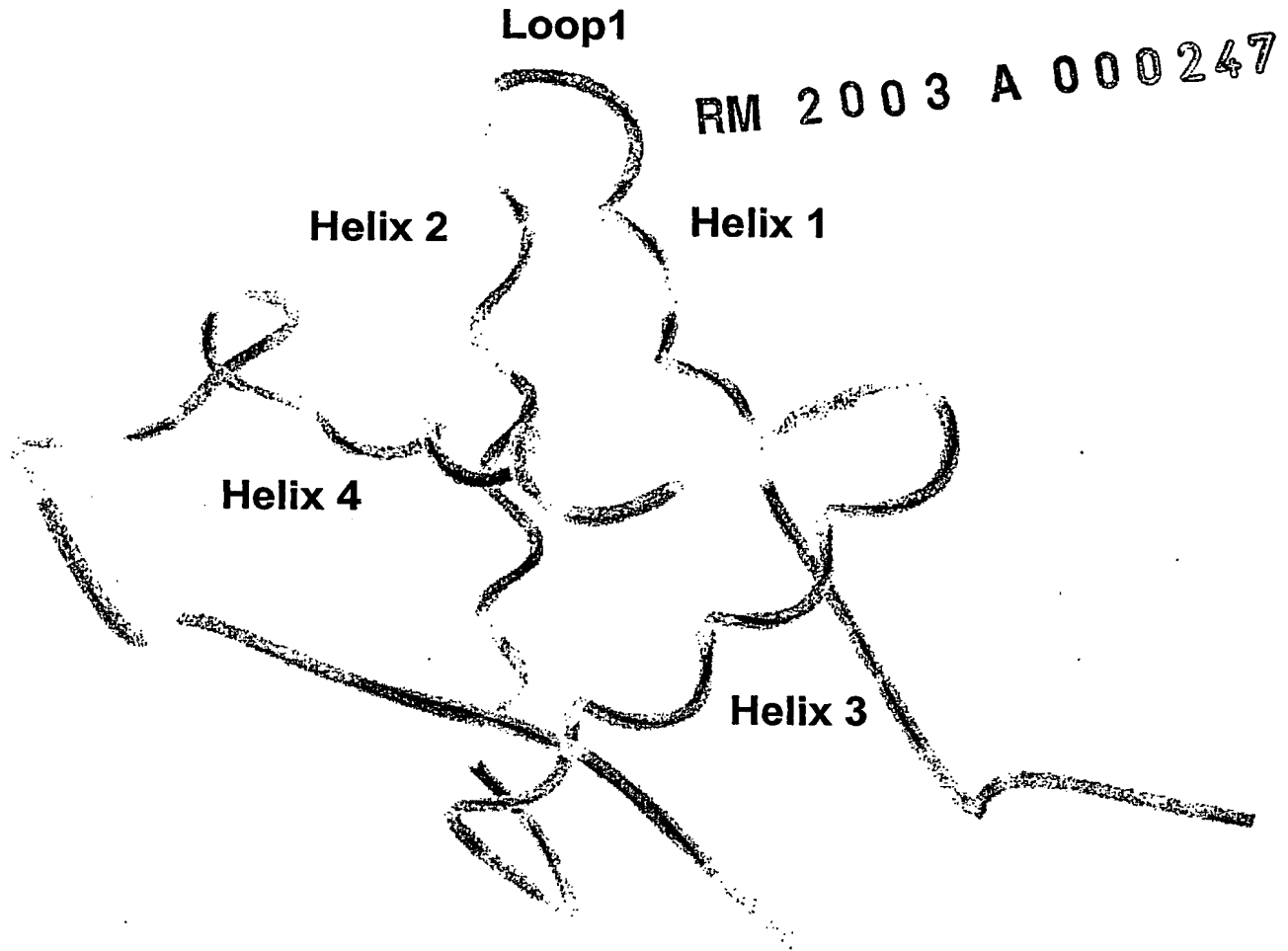
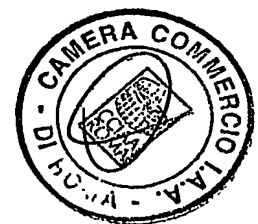


Fig. 2

	1	10	20	↓ ↓	↓	35	45
Parj 1	QETCGTMRV	ALMPCLPFVQ	GKEKE	PSKGCCSGAKR	LDGETKTGP	QRVHACECIQT	
Parj 2	EEACGKVVQ	DIMPCLHFKV	GEEKE	PSKECCSGTKK	LSEEVKTTE	QKREACKCIVR	
		alpha 1	loop1	alpha 2	loop2	alpha 3	

	56	62	71		88
Parj 1	AMKTYS	DIDGKLVSE	VPKHCGIVVSKLPPIDV	NMDCK	TVGVVPRQPQP...----
Parj 2	ATKGISGI	KNELVAEVP	KKCDIKTTLPITA	DFDCS	KIQSTIFRGYY
	Loop3	alpha 4	loop4	beta	

Fig. 3



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'Is.r. 20 B)

Olga Capasso

RM 2003 A 000247

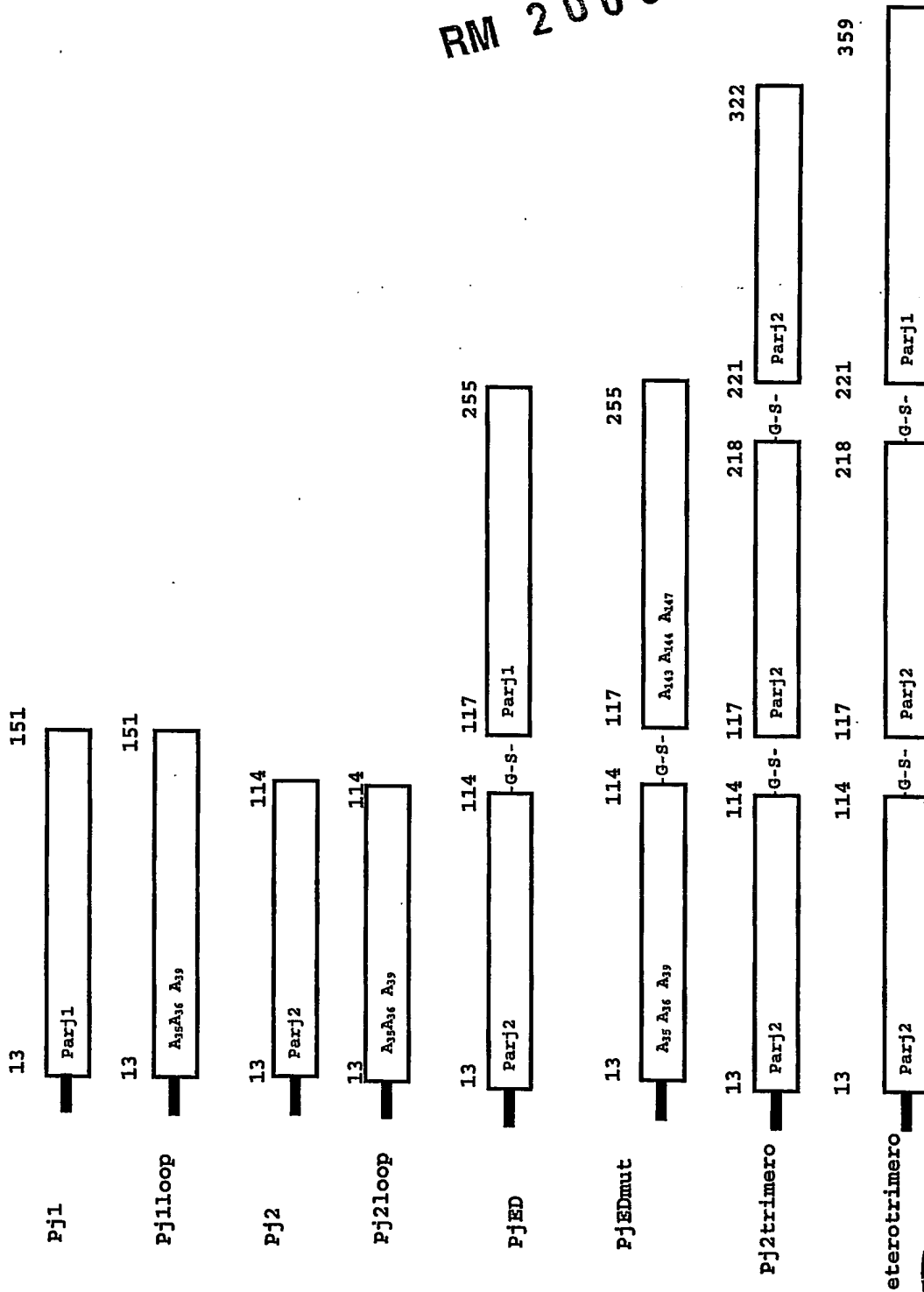


Fig.4



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'Iscri. 820 B)

Olga Capasso

RM 2003 A 000247

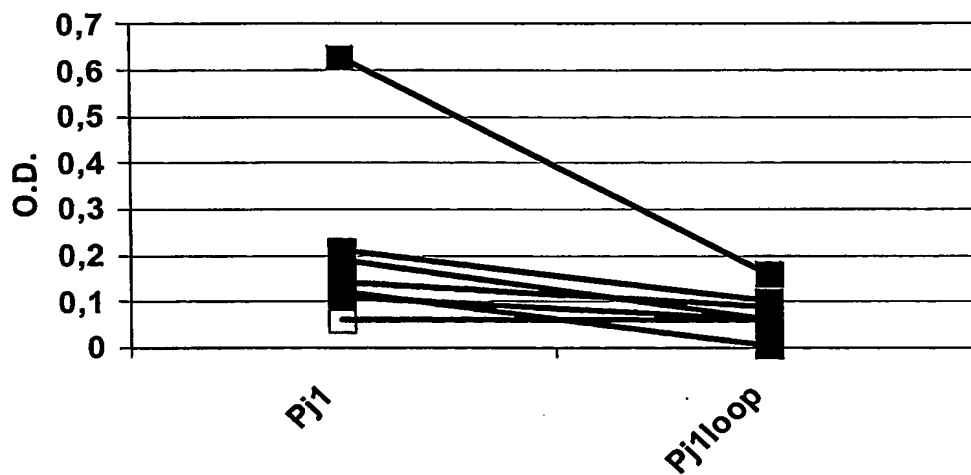
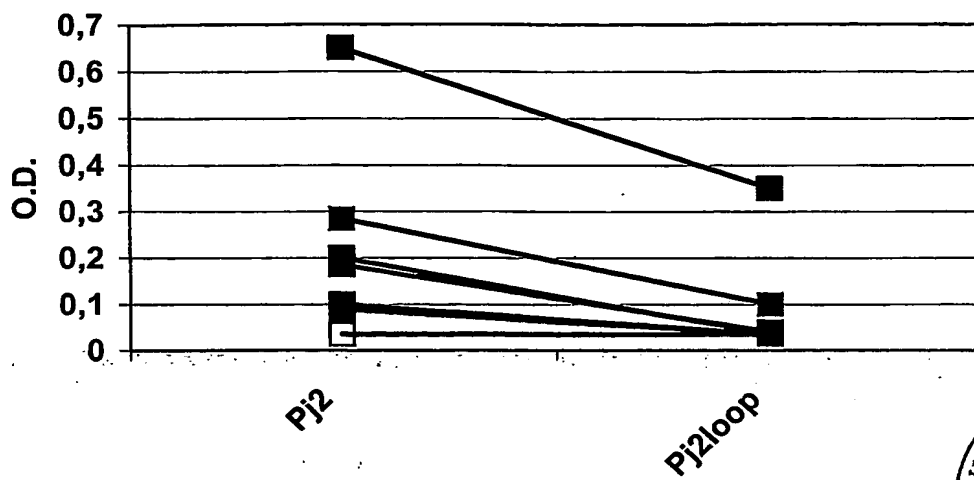
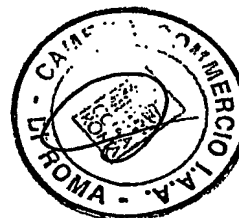


Fig.5

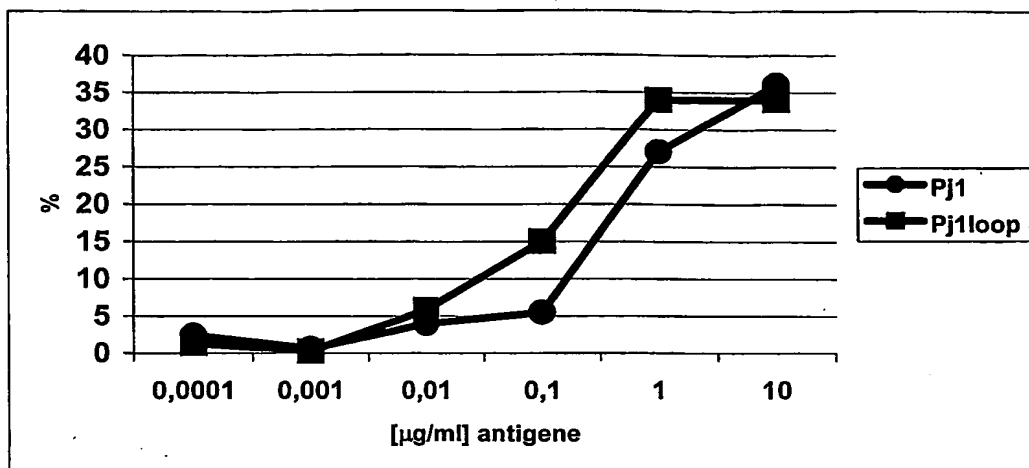


UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 220 B)

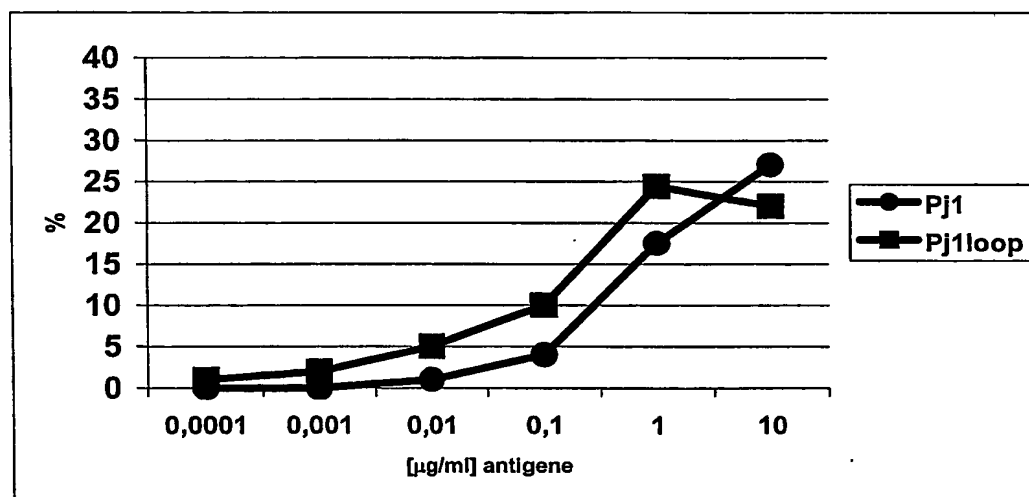
Olga Capasso

RM 2003 A 000247

A



B



C

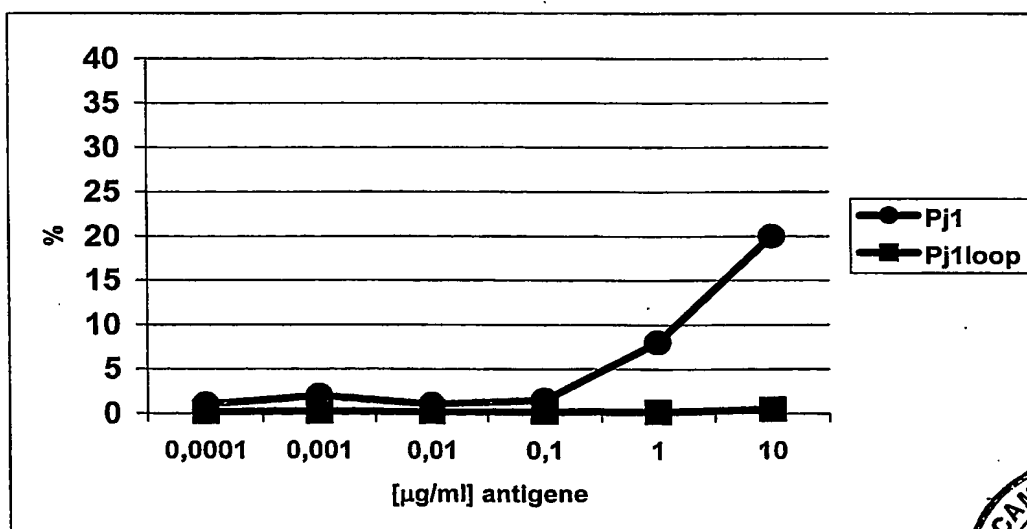


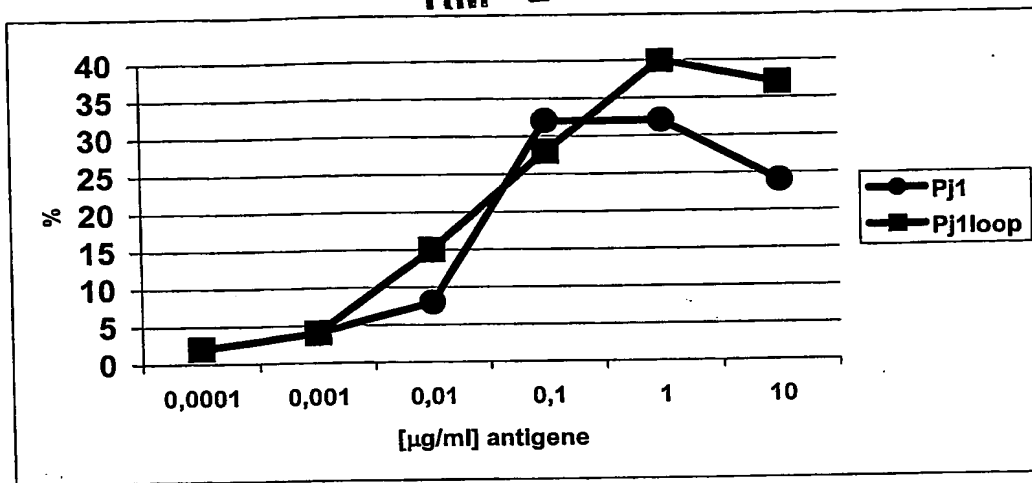
Fig.6

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(n° d'istr. 820 B)
OLGA CAPASSO



RM 2003 A 000247

D



E

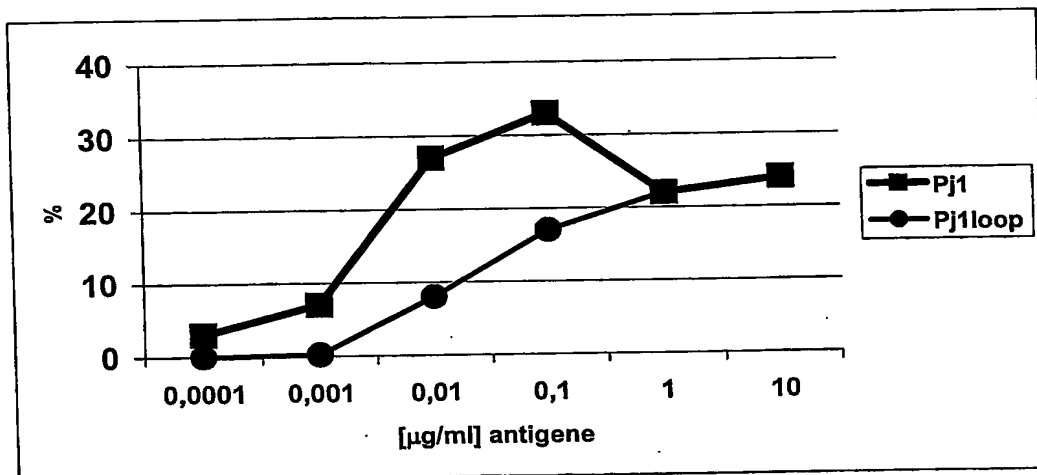


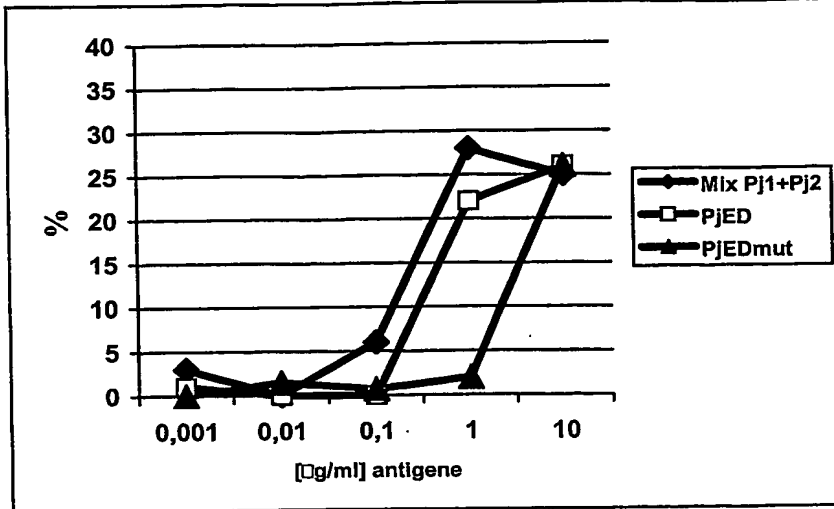
Fig.6



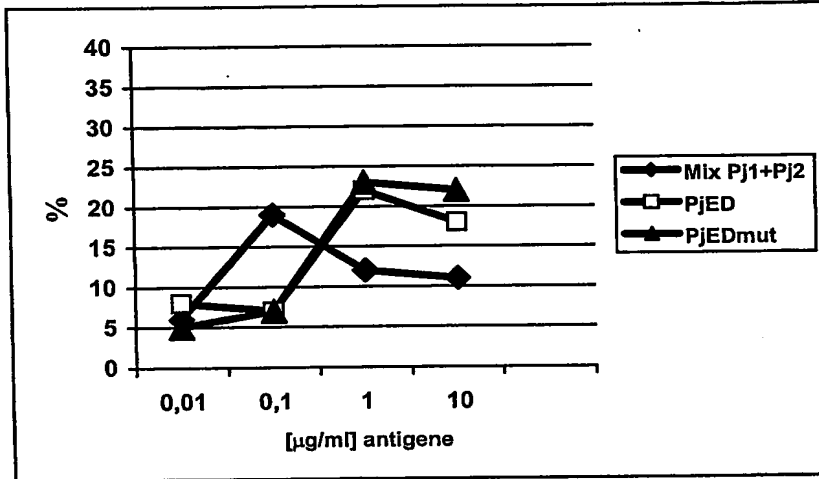
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

olga capasso

F



G



H

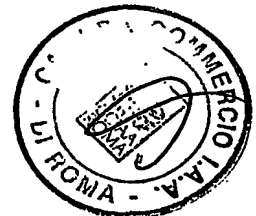
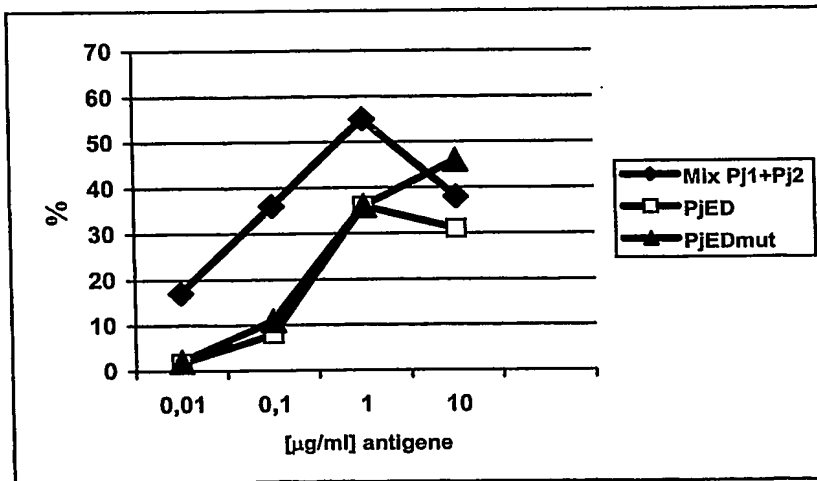


Fig.6

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

Olga Capasso



RM 2003 A 000247

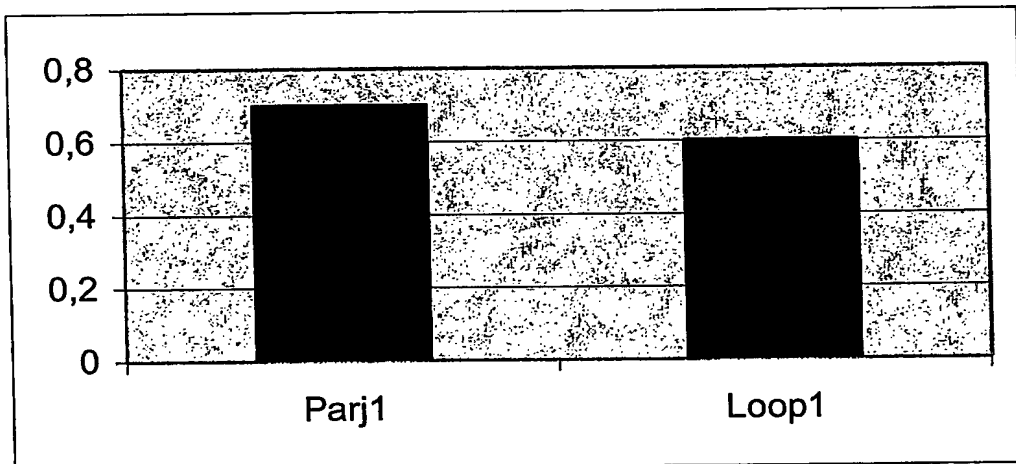
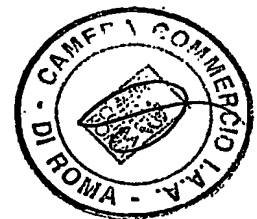


Fig.7



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

Olga Capasso

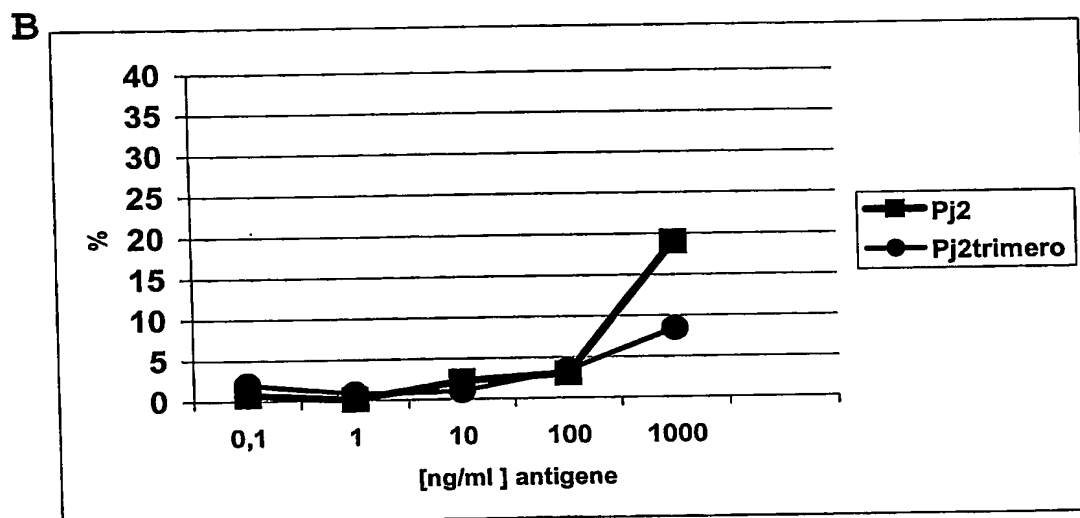
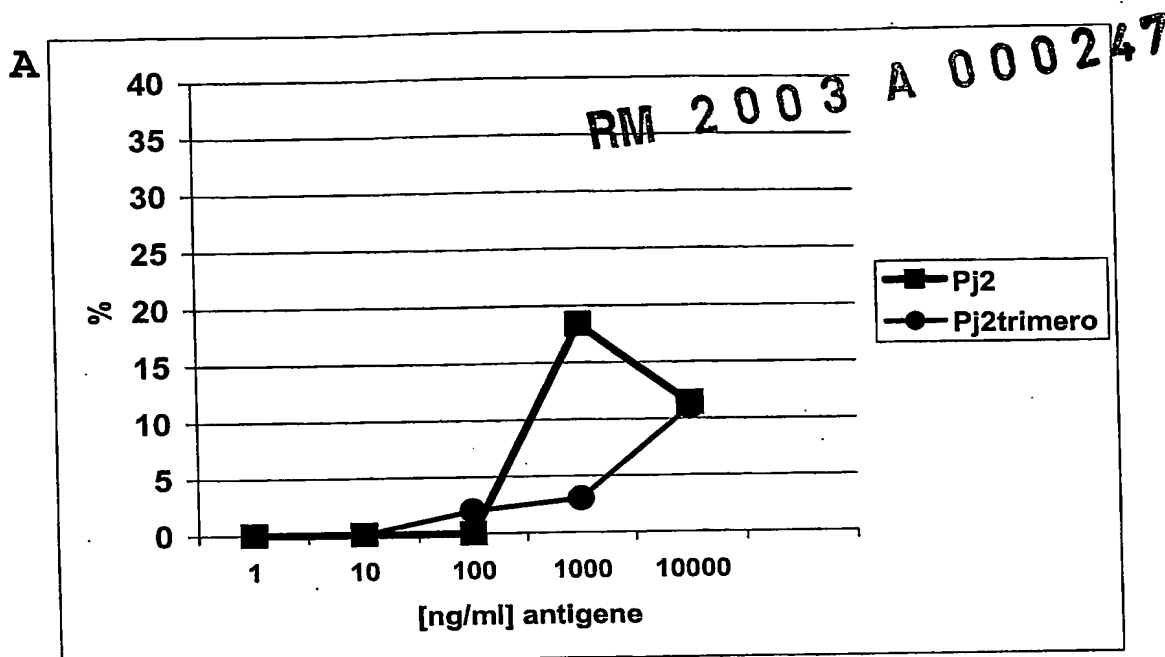
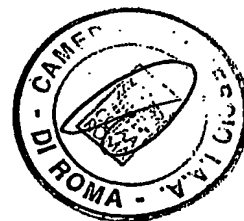


Fig.8



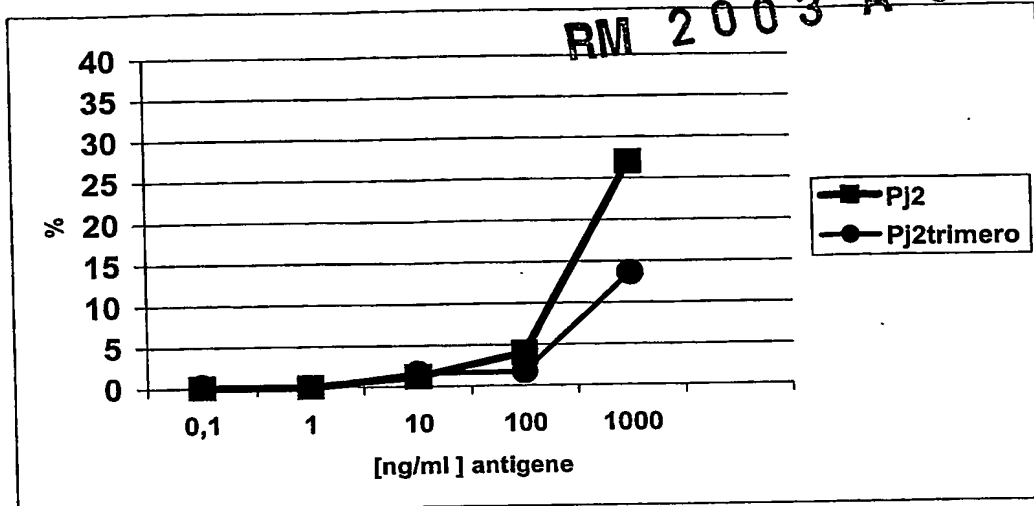
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(AN° 21804. 152015)

Olga Capasso

10/12

RM 2003 A 000247

C



D

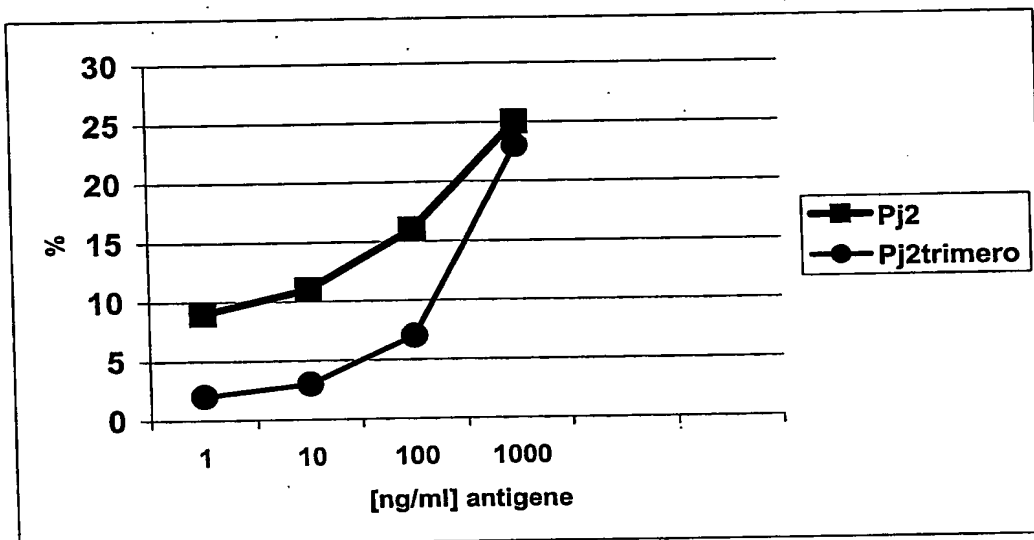


Fig.8

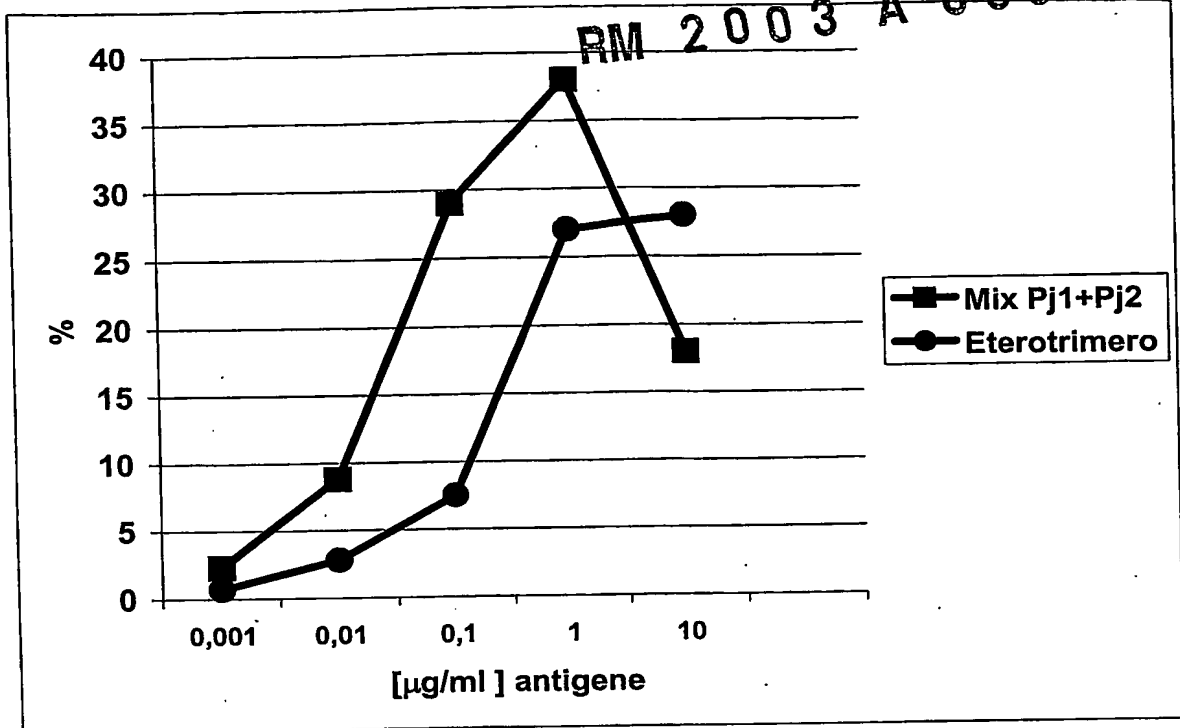


UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

Olga Capasso

RM 2003 A 000247

A



B

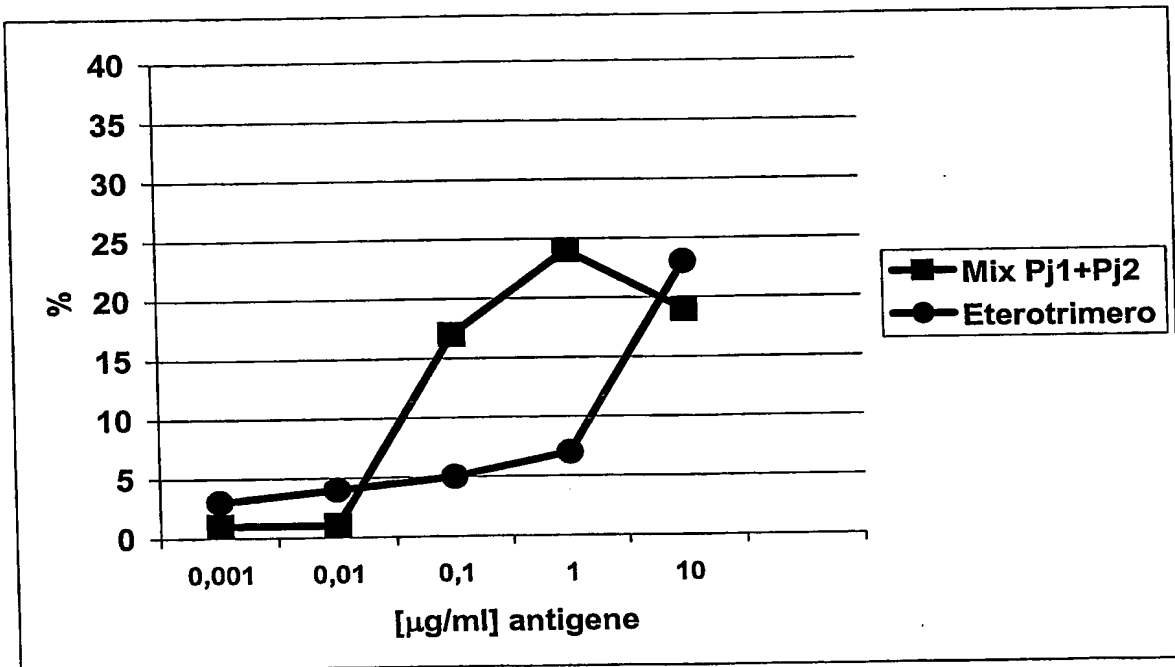


Fig.9

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 220 B)

olga capasso



RM 2003 A 000247

C

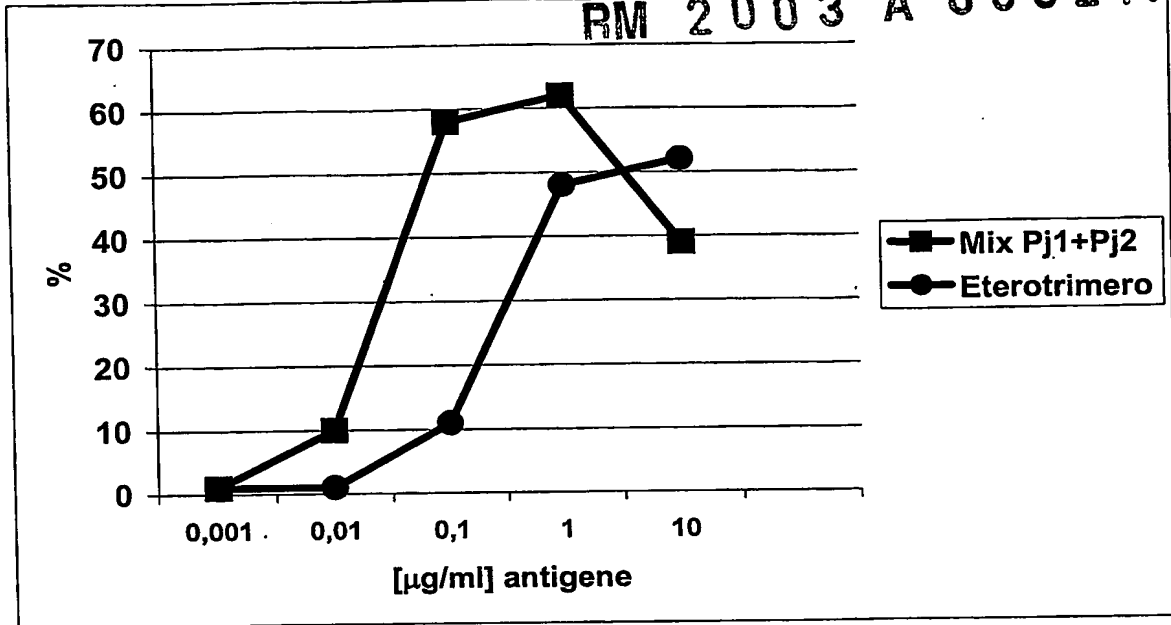


Fig.9



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 620 B)

Olga Capasso